三七皂苷类自毒物质降解细菌分离及其降解特性

向维[1,3]，韦小兰[3]，曹科鑫[3]，李良波[2]，黄荣韶[2*]
（1. 湖南农业大学 园艺学院，长沙 410128；2. 广西中医药大学 药学院，南宁 530200；
3. 广西大学 农学院，南宁 530004）

摘　要：三七是我国名贵药材，连作障碍发生严重，土壤中自毒物质的积累是三七连作障碍发生的原因之一。生物降解土壤中的自毒物质是缓解连作障碍的有效措施，因此筛选自毒物质降解菌，可为连作土壤修复提供生物资源。基于此，该研究采用富集和驯化策略从连作三七根际土壤中分离、筛选三七皂苷类自毒物质降解细菌，并结合 16S rRNA 基因测序对高活性菌株进行分类鉴定，同时对筛选得到的高活性菌株 SC3 的降解特性进行了研究。结果：（1）成功从三七根际土壤中分离出 8 株潜在自毒物质降解细菌，初筛评价结果显示 SC3 菌株对三七总皂苷的降解率最高，达到 87.42%；（2）通过 16S rRNA 基因序列分析，编号 SC3 的高活性菌株被鉴定为寡养单胞菌属（*Stenotrophomonas*）细菌；（3）相同培养条件下，菌株 SC3 对单体皂苷 Rb_1 的降解效果强于对 Rg_1 的降解。（4）液体培养条件下，底物浓度、接种量和培养温度均会显著影响 SC3 菌株对单体皂苷 Rb_1 的降解效果。该研究表明采用富集驯化策略可有效筛选自毒物质降解细菌，SC3 菌株具有消除连作土壤中皂苷类自毒物质的潜力。

关键词：三七，自毒作用，自毒物质，皂苷，生物降解
中图分类号：S182　　　　**文献标识码：A**　　　　**文章编号：**

Isolation and characterization of saponins-degrading bacterial strains from *Panax notoginseng*

XIANG Wei[1,3], WEI Xiaolan[3], CAO Kexin[3], LI Liangbo[2], HUANG Rongshao[2*]
（1. *College of Horticulture*, *Hunan Agricultural University*, Changsha 410128, China;
2. *College of pharmacy*, *Guangxi University of Chinese Medicine*, Nanning 530200, China;
3. *College of Agricultural*, *Guangxi University*, Nanning 530004, China;）

Abstract: *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen is a valuable Chinese herb in China, and the root should be harvested between three and seven years after planting it. However, the growth of *P. notoginseng* is frequently hindered due to replanting failure. There have been numerous studies proving that the accumulation of allelochemicals in the soil is considered to be one of the reasons for the replanting failure of *P. notoginseng*. Biodegradation of allelochemical in soil has been shown to be an effective measure to alleviate continuous cropping obstacles, so screening allelochemical-degrading bacteria could provide biological resources for soil remediation. Based on this, this study adopted a research strategy of enrichment and domestication to isolate and screen saponin-degrading bacteria from the rhizosphere soil of *P. notoginseng*, which had been grown continuously for 3 years and more. Also, the highly active

---

基金项目：国家自然科学基金项目（81860669）；湖南省教育厅科学研究项目（21C0127）[Supported by National Natural Science Foundation of China (81860669)；Scientific Research Foundation of Hunan Education Department (21C0127)]。

第一作者：向维(1990-)，博士，讲师，主要从事中药资源及开发研究，（E-mail）weixiang@hunau.edu.cn。
***通信作者：**黄荣韶，博士，教授，主要从事药用植物繁育与栽培技术研究，（E-mail）hrshao802@163.com。

strains were identified by 16S rRNA gene analysis. In addition, the effect of highly active strain SC3 on degrading allelochemicals under different conditions was studied by HPLC. The results were as follows: (1) Eight strains of potentially degrading bacteria were successfully isolated from the rhizosphere soil of *P. notoginseng*. The results of the initial screening evaluation showed that strain SC3 had the best biodegradation effect on total saponins with 87.42% degradation rate. (2) Strain SC3 was identified as *Stenotrophomonas* sp. based on 16S rRNA gene analysis coupled with physiological and biochemical analyses. (3) The biodegradation of ginsenoside Rb_1 by strain SC3 was stronger than its degradation of ginsenoside Rg_1 under the same culture conditions. (4) The degradation of ginsenoside Rb1 by SC3 strain under liquid culture conditions was significantly affected by different factors, such as substrate concentration, inoculum amount and incubation temperature. This study shows that the enrichment and domestication strategy can effectively screen allelochemical-degrading bacteria, and a possible application of strain SC3 in the bioremediation of saponin contamination in agricultural environments.

Keywords: *Panax notoginseng,* autotoxicity, allelochemical, saponins, biodegradation

三七（*Panax notoginseng*）为五加科人参属植物，是治疗和预防心脑血管疾病的中药原料药材。三七分布范围狭窄，主要分布于云南文山和广西百色一带（黄荣韶等，2007）。但是，市场上的三七主要依靠人工栽培，加之有限的土地资源，造成同一地块连续复种的面积也不断增加。三七等人参属植物是一种忌连作植物，连作往往引起烂根、病害频发等诸多问题，进而导致产量下降甚至绝收（孙雪婷等，2015）。因此，连作障碍已成为制约三七产业发展的重大问题。导致三七连作障碍问题产生的因素主要包括生物、非生物因素引起的土壤理化性状恶化、土传病害加重、自毒物质产生的自毒作用和环境压力等（Liu et al., 2019）。其中自毒作用是导致三七连作障碍的原因之一（谭勇等，2017；Ren et al., 2017；Zhang et al., 2018）。

自毒作用是化感作用的一种表现形式，是植物通过淋溶、挥发、根系分泌和植物残体降解等途径释放某些生物活性物质到环境之中，并对自身的生长发育产生抑制作用。能引起三七自毒作用的物质主要有糖类、氨基酸、有机酸、皂苷类和黄酮类物质（游佩进，2009；向维，2016）。这些物质可由植株通过淋溶、根系分泌等途径释放，并在土壤中累积，直接或间接抑制三七的生长（林娟等，2007）。越来越多的研究证明皂苷类物质对三七生长具有较强自毒活性。Yang 等（2015）在三七连续耕作的土壤和根系分泌物中鉴定出多种皂苷，且随着种植年限的增加部分皂苷会在土壤中积累。三七连作土壤中分离出的多种三萜类皂苷成分，已证明可对三七生长产生自毒作用（Qiao et al., 2019）。另有研究证明单体皂苷 Rg_1 可通过抑制三七根系抗坏血酸过氧化物酶和参与谷胱甘肽酶活性而增加活性氧的积累，从而破坏根细胞膜和细胞壁（Yang et al., 2018）。由此可见，皂苷类物质可通过根系分泌等途径释放到土壤中并积累，加重连作障碍的发生。

目前，缓解三七连作障碍问题多采用轮作、土壤高温消毒和化学防治等措施（Liu et al., 2019）。这些措施，一方面耗时耗力；另一方面过多的化学试剂造成生态的破坏更影响药材的品质。因此，开发绿色防控技术是当务之急。许多情况下，土壤中微生物降解或者转化自毒物质决定着其自毒作用的存在方式与表达。因此，找到自毒物质高效降解菌将为缓解连作障碍提供一种新的途径。土壤微生物是土壤微生态中最重要的功能组分，其在物质与能量循环、土壤结构、自毒物质降解、病原微生物调控及土壤微生态平衡保持等方面发挥着重要作用（Berendsen et al., 2018；Lundberg & Teixeira, 2018）。已有大量研究证明，微生物对降解土壤中积累的自毒物质有较好的效果（李茹和陈鹏，2011；李敏等，2019；Liu et al., 2019）。目前，研究人员已经筛选到了一些能降解自毒物质的细菌，主要针对酚酸类物质，这些微生物主要来源于土壤等外界环境，如假单胞菌（*Pseudomonas*）、根瘤菌（*Rhizobia*）、芽孢杆菌（*Bacillus*）、链霉菌（*Streptomyces*）等（李敏等，2019）。但是对于总皂苷类物质降解菌株的报道较少。筛选并利用降解菌使土壤中皂苷类自毒物质快速消减，对后续开展连作土壤生物修复的研究具有重要的意义。

本研究以皂苷类自毒物质为筛选靶标，采用富集驯化策略从三七根际土壤中分离降解细菌，同时结合 16S rRNA 基因测序分析对活性菌株进行分类鉴定，综合利用化学法、色谱法评价分离菌株的降解能力，拟探讨以下问题：（1）从连作三七根际土壤筛选皂苷类自毒物质降解细菌的可行性；（2）菌株对三醇型和二醇型皂苷降解能力的差异；（3）液体培养条件下，不同因素对降解菌降解能力的影响。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

在广西百色市那坡县三七人工种植基地（A，105°55'56" E、23°34'11" N）、广西百色市田林县三七人工种植基地（B，106°3'1" E、24°11'28" N）、那坡县某农户家半野生三七地（C，105°54'29" E、23°21'51" N）、云南文山市三七人工种植基地（D，103°50'33" E、23°57'38" N）采集样品。每个采样地随机选取 5 个点，选择三年生及以上健康三七，用铁铲小心地将植株连根挖出，抖落根围土壤，用刷子轻刷根系收集根际土壤。

1.2 试剂与仪器

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司，Biolog GenIII 鉴定微孔板购自美国 BIOLOG 公司。紫外分光光度计(UV1800，日本岛津公司)、菌种鉴定仪(GEN III，美国 BIOLOG 公司）、PCR 仪（impliAmp，赛默飞世尔科技有限公司）。

Luria-Bertani 培养基（LB，pH 7.0）含胰蛋白胨 10.0 $g·L^{-1}$，酵母提取物 5.0 $g·L^{-1}$ 和 NaCl 10.0 $g·L^{-1}$。

无机盐离子培养基(MSM，pH 7.0)含($(NH_4)SO_4$ 1.0 $g·L^{-1}$、KH_2PO_4 0.5 $g·L^{-1}$、K_2HPO_4 1.5 $g·L^{-1}$、NaCl 1.0 $g·L^{-1}$ 和 $MgSO_4·7H_2O$ 0.1 $g·L^{-1}$。

TSA 培养基（pH 7.0）：胰蛋白胨 15 $g·L^{-1}$，大豆蛋白胨 5 $g·L^{-1}$，氯化钠 5 $g·L^{-1}$。

1.3 降解菌的富集与驯化

将土壤样品中的杂物清理干净，取不同采样点的土壤样品 5 g，分别添加到 100 mL 含有 50 $mg·mL^{-1}$ 总皂苷的 MSM 液体培养基中，置于 30 ℃，180 $r·min^{-1}$ 的恒温培养振荡器中培养 7 d。此后每 7 d 取上一次培养液 10 mL 并转接到新的 MSM 培养液中，并提高总皂苷的底物浓度至 100 $mg·mL^{-1}$，于相同条件下培养。重复此操作，并提高底物浓度（2 倍法）直至总皂苷最高浓度达到 400 $mg·mL^{-1}$。每个处理均设 3 次重复，以加入无菌水为空白对照（刁硕等，2017）。

1.4 降解菌的分离及纯化

取最后一次富集菌液，将菌液 10 倍比稀释，吸取一定量的稀释液分别涂布至 LB 固体培养基上，以无菌水为对照，置于 30 ℃的恒温培养箱中培养，观察并记录菌落形状、大小、透明度及颜色等。将同一平板上不同形态的菌落分别接种至含 400 $mg·mL^{-1}$ 三七总皂苷的 MSM 固体培养机上划线培养，直至长出单菌落。继续挑选单菌落划线培养，重复此步骤，至平板上所有菌落的外部形态一致。将分离纯化后的菌株分别用甘油超低温和真空冻干 2 种保存方法保存，备用。

1.5 降解能力初筛

将纯化后的菌种接种于 LB 培养基中培养 24 h，用无菌水重悬菌液并取 5 mL 菌液接种到含有 200 $mg·mL^{-1}$ 总皂苷的 100 mL MSM 液体培养基中，在 30 ℃和 180 $r·min^{-1}$ 条件下培养，所有处理重复 3 次，以接种无菌水为对照。96 h 后，对培养物离心并收集上清液，上清液用氯仿萃取，保留氯仿层并挥干，用乙醇定量溶解后基于香草醛法测定培养液中总皂苷含量（丁永丽等，2013）。此外，精密配制分别含 50、100、150、200 和 250 $mg·mL^{-1}$ 浓度的总皂苷供试溶液，以 MSM 培养基为校正空白，测量总皂苷含量。最后，以总皂苷浓度为横坐标，吸光值为纵坐标绘制标准曲线，计算校正方程和 R^2 值。

1.6 降解菌 16S rRNA 基因序列分析

使用基因组 DNA 抽提试剂盒提取细菌基因组，使用通用引物 27F 和 1492R 从基因组扩增 16S rRNA 基因（Xiang et al., 2020）。PCR 产物委托给上海生工进行测序。所得的 16S rRNA 基因序列提交给 EzBioCloud 在线鉴定，并将序列上传至 GenBank 数据库，通过 MEGA X 软件使用邻位算法(Neighbor-Joining method)构建系统发育树，采用 Bootstrap = 1 000 检验各分支的置信度(Sudhir et al., 2018）。

1.7 菌株 SC3 的降解特性研究

1.7.1 菌株 SC3 对单体皂苷的降解

配制含人参皂苷 Rb_1 质量浓度分别为 25、50、100、200、400 mg·mL^{-1} 的 MSM 液体培养基，pH7.0，含人参皂苷 Rg_1 的 MSM 培养基配置浓度同上。在无菌条件下，将 SC3 供试菌液以 5%（*V/V*）接种量接入培养基中，以不接种菌株为对照，培养基置于 30 ℃、180 r·min^{-1} 条件下的摇床中培养，所有试验重复 3 次。96 h 后，每瓶培养基取 3 mL 菌液在 9 500 r·min^{-1} 条件下离心 2 min，取上层清液过 0.22 μm 有机滤膜，参考 Zhou 等（2008）方法通过 HPLC 检测样品含量。

1.7.2 接种量对降解效果的影响

以含 400 mg·mL^{-1} 人参皂苷 Rb_1 的液体 MSM 培养基（pH=7.0）为基础，控制 SC3 供试菌液以 5%、10%、15%、20%（*V/V*）的接种量接入培养基中，30 ℃、180 r·min^{-1} 振荡培养，以不接种降解菌的培养基为对照。3 次重复，在培养 120 h 后，通过 HPLC 分析样品。

1.7.3 培养温度对降解效果的影响

以含 400 mg·mL^{-1} 人参皂苷 Rb_1 的液体 MSM 培养基（pH=7.0）为基础，控制 SC3 供试菌液以 5%、10%、15%、20%（*V/V*）的接种量接入培养基中，30 ℃、180 r·min^{-1} 振荡培养，以不接种降解菌的培养基为对照。3 次重复，在培养 120 h 后，通过 HPLC 分析样品。

1.7.4 pH 对降解效果的影响

SC3 供试菌液以 5%（*V/V*）的接种量接种到含 400 mg·mL^{-1} 人参皂苷 Rb_1 的液体 MSM 培养基中，控制培养基 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0，30 ℃、180 r·min^{-1} 振荡培养，以不接种降解菌的培养基为对照。3 次重复，在培养 120 h 后，通过 HPLC 分析样品。

1.7.5 人参皂苷 Rb_1 降解过程跟踪

根据单因素试验结果，在优化条件下测量 SC3 菌株对人参皂苷 Rb_1 的降解曲线。以 400 mg·mL^{-1} 人参皂苷 Rb_1 的液体 MSM 培养基为基础，调 pH 至 7.0 左右，将 SC3 供试菌液以 5%（*V/V*）的接种量接入培养基中，以未接种菌株为对照组，30 ℃、180 r·min^{-1} 振荡培养，设 3 次重复。培养期间每隔 12 h 取样 10 mL，通过 HPLC 分析 Rb_1 残留量。

1.8 数据处理

数据分析均使用 SPSS（v24.0）软件进行，统计学差异显著性通过 Duncan 和 LSD 检验进行评估。

2 结果与分析

2.1 三七皂苷类自毒物质降解菌的分离及筛选

基于光学显微镜形态鉴定，从 LB 培养基上挑选颜色或形态特征具有差异的微生物，经划线纯化后获得细菌分离物 8 株，编号为 SAZ3、PSCZ2、SCZ1、SC2、SC3、SBZ1、PSBZ1 和 SDZ1。基于香草醛法初步测定了潜在三七皂苷降解菌的降解能力，结果如表 1 所示。检测方法线性考察的结果显示，在三七总皂苷浓度为 50~250 mg·mL^{-1} 范围内时吸光度与浓度线性关系良好，可用于目标范围内含量的计算。在以三七总皂苷为唯一碳源的 MSM 液体培养基中，其自然降解率约为 15%。这些菌株对三总皂苷的相对降解率范围在 3.31%~87.42%之间，其中菌株 SC3 对三七总皂苷的降解率最大。

表 1 总皂苷生物降解

Table1 Biodegradation of total saponins

菌株编号 Isolate No.	来源 Source	降解率 Degradation (%)
SAZ3	广西那坡县 Napo County, Guangxi	14.03±1.15 e
PSCZ2	广西那坡县 Napo County, Guangxi	50.92±1.13 c
SCZ1	广西那坡县 Napo County, Guangxi	50.24±2.08 c
SC2	广西那坡县 Napo County, Guangxi	72.58±5.72 b
SC3	广西那坡县 Napo County, Guangxi	87.42±2.21 a
SBZ1	广西田林县 Tianlin County, Guangxi	27.31±1.15 d
PSBZ1	广西田林县 Tianlin County, Guangxi	3.31±0.82 f
SDZ1	云南文山市 Wenshan City, Yunnan	4.81±4.43 f

注：数值为平均值±标准差。不同小写字母表示不同组间降解率存在显著差异（P<0.05)。

Note：Values are x±s. Different lowercase letters indicate significant differences in degradation rates among different groups (P<0.05).

2.2 降解菌的 16S rRNA 基因鉴定

提取降解菌的基因组 DNA，并完成 16S rRNA 基因测序，将得到的序列与数据库已知序列进行 BLAST 比对，结果见表 2，图 1 为高效降解菌株 SC3 与相似度较高对照菌的系统进化树。菌株 SC3 与 *Stenotrophomonas nitritireducens* 同源性最近，序列相似性达 98.07%。综合分析将这株菌鉴定为寡养单胞菌属（*Stenotrophomonas*）细菌。菌株序列已提交至 GenBank 数据库，登录号为 MW045205。

表 2 基于 16S rRNA 基因分析的皂苷降解菌鉴定

Table 2 Identification of saponin-degrading bacteria based on 16S rRNA gene analysis

菌株编号 Isolate No.	最相似分类 Top-hit taxon	最相似菌株 Top-hit	相似度 Similarity (%)
SAZ3	*Providencia vermicola*	OP1	99.10
PSCZ2	*Burkholderia ubonensis*	CIP107078	99.09
SCZ1	*Enterobacter soli*	BAA2102	98.74
SC2	*Pseudomonas hunanensis*	LV	99.86
SC3	*Stenotrophomonas nitritireducens*	DSM 12575	98.07
SBZ1	*Comamonas testosteroni*	ATCC11996	99.72
PSBZ1	*Lelliottia jeotgali*	PFL01	98.43

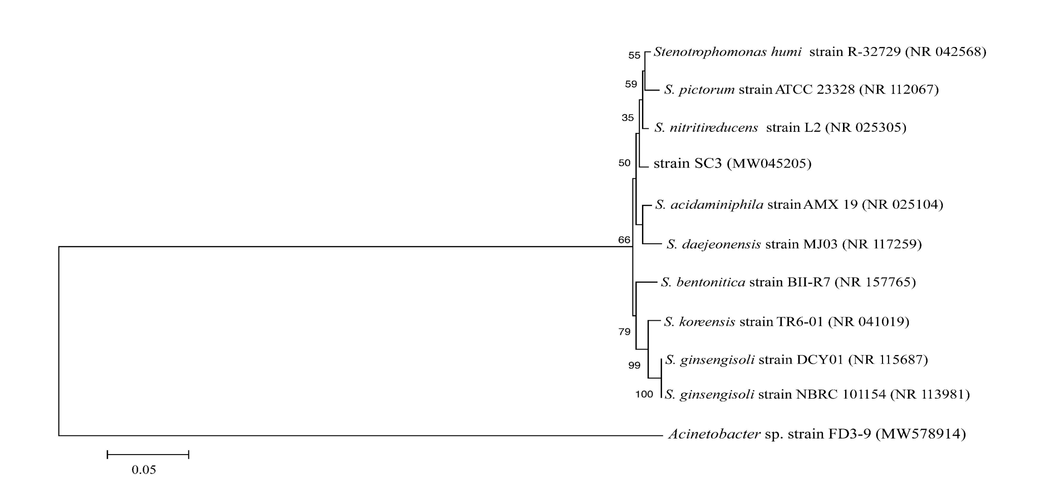


图 1 菌株 SC3 系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of strain SC3

2.3 菌株 SC3 对单体皂苷的降解特性

2.3.1 菌株 SC3 对单体皂苷 Rg_1 和 Rb_1 的降解

标准曲线结果显示当人参皂苷 Rg_1 检测浓度为 3.125~400 mg·mL^{-1} 时、人参皂苷 Rb_1 检测浓度为 25~400 mg·mL^{-1} 时浓度与峰面积线性关系良好。将 SC3 菌株分别接种至以这两种单体皂苷为唯一碳源的 MSM 培养基中，结果如表 3 所示。在接种 96 小时后，菌株 SC3 对不同浓度 Rb_1 降解量均高于对 Rg_1 的降解，对 400 mg·mL^{-1} 的 Rb_1 降解率接近 90%。因此，接下来研究菌株 SC3 对 Rb_1 的降解，并优化培养条件。

表 3 菌株 SC3 对单体皂苷的降解

Table 3 Degradation of Ginsenoside by strain SC3

浓度 Concentration (mg·mL^{-1})	降解率 Degradation (%)	
	人参皂苷 Rg_1 Ginsenoside Rg_1	人参皂苷 Rb_1 Ginsenoside Rb_1
25	2.67	21.21 *
50	15.95	65.42 *
100	14.11	68.22 *
200	9.66	75.86 *
400	16.99	88.41 *

注：*表示差异性显著(P<0.05)。

Note：An asterisk indicates significant differences between treatments (P<0.05).

2.3.2 不同因素对菌株 SC3 降解人参皂苷 Rb_1 的影响

在以 400 mg·mL^{-1} 人参皂苷 Rb_1 为唯一碳源的 MSM 培养基中，不同接种量、培养温度和 pH 值对菌株 SC3 降解人参皂苷 Rb_1 的影响。结果表明，不同因素对降解率影响存在显著差异。不同菌液接种量条件下，人参皂苷 Rb_1 的降解率均较高，当接种量为 10%时降解效果最好，并显著高于另外 3 组（P<0.05），即使是最低降解组（20%接种量）其降解率均值也达到 86%（图 2）。菌株 SC3 对培养温度具有良好的耐受力，在 25~40℃之间，对人参皂苷 Rb_1 的降解率均大于 80%。而在培养温度为 30 和 35℃时，降解效果显著好于其他组（P<0.05）（图 3）。菌株 SC3 对培养基 pH

较为敏感，在 pH 为 4 和 5 时，降解率低于 60%。在 pH 为 7 和 8 时，降解率均超过 90%，显著高于其他 pH 处理组（图 4）。

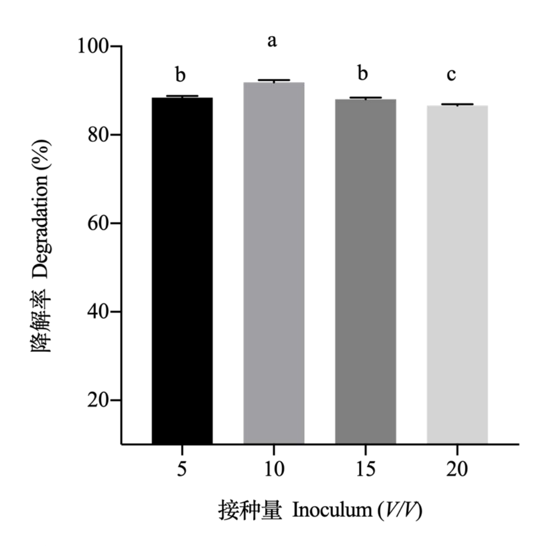


图 2 接种量对菌株 SC3 降解人参皂苷 Rb_1 的影响

Fig. 2 The effects of inoculum on Ginsenoside Rb_1 degradation by strain SC3

注：误差线代表 3 次重复的标准误，图中相同的小写字母表示在 P <0.05 时各处理之间差异显著。

Note: Error bars represent the standard error of three replicates. Identical lowercase letters in each panel indicate significant differences between treatments at P<0.05.

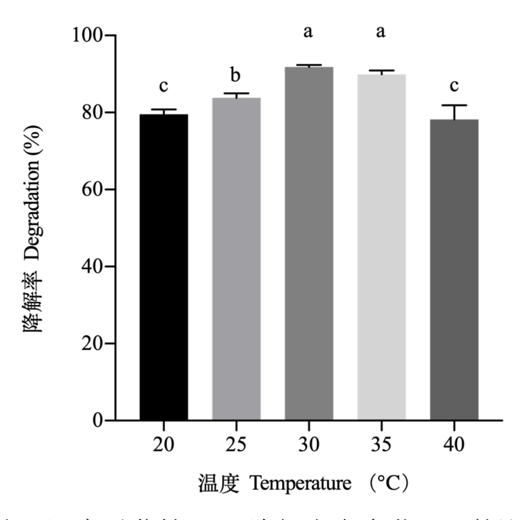


图 3 温度对菌株 SC3 降解人参皂苷 Rb_1 的影响

Fig. 3 The effects of temperature on Ginsenoside Rb_1 degradation by strain SC3

注：误差线代表 3 次重复的标准误，图中相同的小写字母表示在 P <0.05 时各处理之间差异显著。

Note: Error bars represent the standard error of three replicates. Identical lowercase letters in each panel indicate significant differences between treatments at P<0.05.

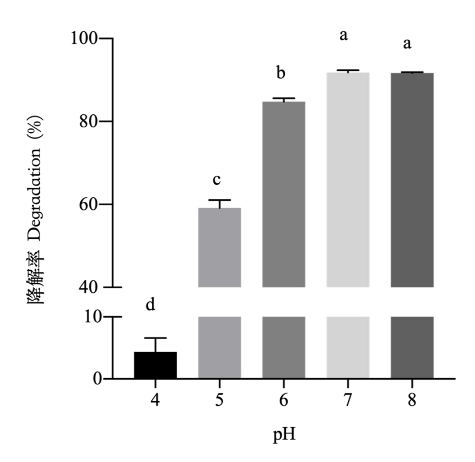


图 4 pH 对菌株 SC3 降解人参皂苷 Rb_1 的影响

Fig. 4 The effects of pH on Ginsenoside Rb_1 degradation by strain SC3

注：误差线代表 3 次重复的标准误，图中相同的小写字母表示在 *P* <0.05 时各处理之间差异显著。

Note: Error bars represent the standard error of three replicates. Identical lowercase letters in each panel indicate significant differences between treatments at *P*<0.05.

2.3.3 菌株 SC3 降解人参皂苷 Rb_1 的过程跟踪

选用底物浓度 400 mg·mL^{-1}、培养基 pH 7.0、培养温度 30℃和接种量 10%（*V/V*）条件，对菌株 SC3 降解人参皂苷 Rb_1 的过程进行跟踪监测，96 h 内结果如图 5、图 6 所示。可以观察到，人参皂苷 Rb_1 在前 12 h 降解较少，第 48 h 时，人参皂苷 Rb_1 降解超过 62%，60 h 后降解速率明显放缓，最终在 96 h 后接近完全降解。

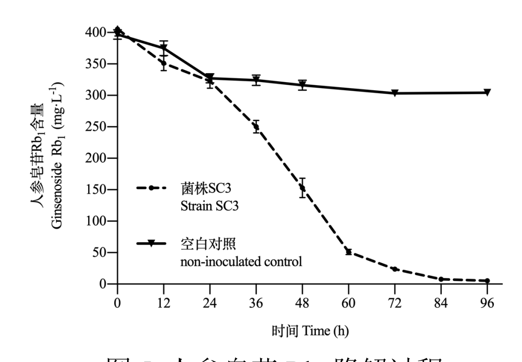


图 5 人参皂苷 Rb_1 降解过程

Fig. 5 Degradation process of Ginsenoside Rb_1

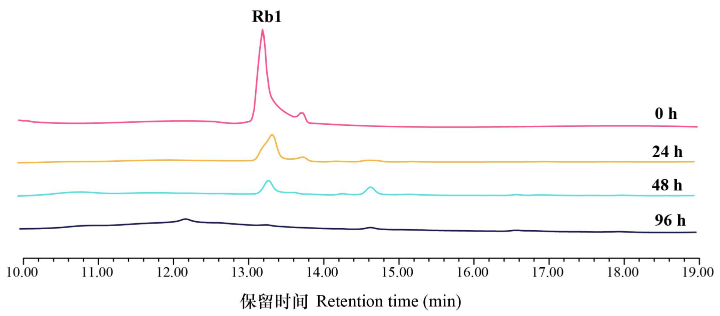


图 6 人参皂苷 Rb_1 HPLC 色谱图

Fig. 6 HPLC chromatograms of Ginsenoside Rb_1

3 讨论与结论

研究证明，利用从植物根际筛选的微生物来降解自毒物质，是行之有效的方法。王罗涛等（2020）从三七根际土壤筛选出一株对皂苷具有较好降效效果的蒙氏假单胞菌菌株 PM-41，且对毁灭柱孢菌具有明显拮抗活性。本研究采用类似策略，从三七根际土壤中成功分离出 8 株潜在降解细菌，它们均能在以皂苷为唯一碳源的无机盐培养基中生长，其中菌株 SC3 菌株对皂苷的降解效果最好。该策略是利用了细菌的趋化性，利用自毒物质对目标微生物进行富集。研究表明细菌能在化学物质的影响下移动，要么靠近要么远离异源物质，这有助于细菌找到生长和生存的最佳条件（朱晓艳等，2019）。这些化学物质作为微生物吸引剂，是引起土壤微生物群落动态变化或组成的主要驱动因素，并为土壤微生物提供了主要碳和能源（Lundberg & Teixeira, 2018）。例如，糖、氨基酸和糖醇等是普遍的微生物吸引剂，酚类和黄酮类化合物是某些特定微生物的信号分子（李茹等，2011）。三七是多年生植物，其根系分泌物积聚在根际中并为微生物生长提供底物，久而长之，不能适应环境变化的菌种被淘汰（Zhang et al., 2019）。可以推测，三七根际土壤中还存在着大量能高效利用这些物质生长的微生物。本研究结果也证明，从根际土壤中筛选的菌株具有高效降解自毒物质的能力。但是，该菌株在连作土壤生态修复中的作用还有待于进一步研究。

三七连作根际土壤中人参皂苷 Rb_1 和 Rg_1 的含量占比最高（Yang et al., 2015），因此本研究针对这两种单体皂苷进行了降解研究。本研究中发现，菌株 SC3 在以 Rg_1 为唯一碳源时，生长速率明显缓于在以 Rb_1 为唯一碳源时的生长，菌株 SC3 对人参皂苷 Rb_1 的降解率显著大于对人参皂苷 Rg_1 的降解。研究表明，微生物分泌的酶可对皂苷 C-3、C-6 或 C-20 位上的糖基进行水解，不同微生物或不同特异性的酶决定了皂苷的降解效果和途径。人参皂苷 Rg_1 和 Rb_1 分别属于三醇型和二醇型皂苷，它们在结构上有着明显的差异。人参皂苷 Rb_1 的 C-20 位是以β-（1，6）糖苷键相连接的二个葡萄糖，Rg_1 的 C-20 位是以α-（1，6）糖苷键相连接二个不同类型糖（Bi et al., 2019）。这说明 Rb_1 分解的糖苷降解酶能特异性地作用于某个位点，不同的空间结构会对酶的作用产生阻碍作用。张庆锋等（2021）报道菌株分泌的β-葡萄糖苷酶能作用于 C-3 和 C-20 位置上的特定糖苷键。刘欣茹等（2018）构建了β-葡萄糖苷酶基因的表达载体并转化至赤酵母中表达，并利用工程菌成功将人参皂苷 Rb_1 进行转化。据报道，人参皂苷 Rb_1 在微生物的作用下可通过 Rb_1→GXVII→F_2→C-K、Rb_1→Rd→F_2→C-K、Rb_1→GXVII→GLXXV→C-K 和（Shen et al., 2013；赵倩等，2021）等途径进行转化或降解。这些途径除了需要水解β-葡萄糖外，还需要可以水解呋喃阿拉伯糖、吡喃阿拉伯糖或木糖的糖苷酶。

此外，非酶促作用也可导致皂苷的降解。本研究发现在未加入降解菌的对照组中，特别是培养液 pH 较低时对照组中皂苷自然降解率更高，这主要是由于存在皂苷酸水解现象。Shen 等（2013）研究发现无微生物作用下，在 pH 为 1.2 去离子水中人参皂苷 Rb_1 能在 1 小时内水解超过 50%。二醇型人参皂苷在酸性条件下会发生取代糖基的水解、脱水和加成反应（赵乐凤等，2018）。前述研究表明，皂苷在酸性条件下能有效的自然降解。但是，种植土壤很难达到这种酸性条件，且土壤过度酸化也不利于植物的生长（Wang et al., 2020）。

综上所述，采用富集驯化策略可有效筛选自毒物质降解菌，该研究从三七根际土壤和中共分离出 8 株潜在自毒物降解细菌，但其降解能力存在差异。通过进一步对降解菌的降解特性研究发现，同一菌株对不同类型的皂苷降解能力也存在差异，该研究中的菌株 SC3 可对二醇型皂苷 Rb_1 高效降解，但对三醇型人参皂苷 Rg_1 降解能力较弱。研究结果可为今后深入研究皂苷降解机制提供理论依据，并为开展三七连作土壤生态修复提供技术参考。

参考文献:

BERENDSEN R L, VISMANS G, YU K, et al., 2018. Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium[J]. ISME J, 12(6): 1496-1507.

BI YF, WANG XZ, JIANG S, et al., 2019. Enzymatic Transformation of Ginsenosides Re, Rg1, and Rf to Ginsenosides Rg2 and Aglycon PPT by Using β-Glucosidase from Thermotoga Neapolitana[J]. Biotechnol Lett, 41(4): 613-623.

DIAO S, WANG HQ, XU J, et al., 2017. Isolation, identification and analysis of degradation ability of a cold-resistant haloduric pyrene-degrading strains[J]. China Environ Sci, 37(2): 677-685. [刁硕，王红旗，许洁，等，2017. 低温耐盐芘降解菌的筛选鉴定及降解特性研究[J]. 中国环境科学，37（2）：677-685.]

DING YL, WANG YZ, ZHANG J, et al., 2013. Application of vanillin sulfuric acid colorimetry-ultraviolet spectrometry on quality evaluation of Panax notoginseng[J]. Spectrosc Spectral Anal, 33(2): 471-475. [丁永丽，王元忠，张霁，等，2013. 硫酸香草醛显色-紫外吸收光谱法在三七质量评价中的应用[J]. 光谱学与光谱分析，33（2）：471-475.]

HUANG RS, YANG HJ, HE ZJ, et al., 2007. Textual research on the origin areas of *Panax notoginseng*[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 18(7): 1610-1611. [黄荣韶，杨海菊，贺紫荆，等，2007. 三七原产地的再考证[J]. 时珍国医国药，18（7）：1610-1611.]

LI M, ZHANG LY, ZHANG YJ, et al., 2019. Review on the microbial biodegradation and metabolism of autotoxic phenolic acids[J]. Asian J Ecotoxicol, 14(3): 72-78. [李敏，张丽叶，张艳江，等，2019. 酚酸类自毒物质微生物降解转化研究进展[J]. 生态毒理学报，14（3）：72-78.]

LI R, CHEN P, 2011.Progress in mechanism of signal transduction and regulation in bacterial chemotaxis[J]. Biotechnol BullaBIOTECH, (11): 54-57. [李茹，陈鹏，2011. 细菌趋化性的信号传导及调节机制研究进展[J]. 生物技术通报，（11）：54-57.]

LIN J, YIN QY, YANG BZ, et al., 2007. Review on allelopathy of plants[J]. Chin Agric Sci Bull, 23(1): 68-725. [林娟，殷全玉，杨丙钊，等，2007. 植物化感作用研究进展[J]. 中国农学通报，23（1）：68-725.]

LIU HJ, YANG M, ZHU SS. 2019. Strategies to solve the problem of Soil sickness of *Panax notoginseng* (Family: Araliaceae) [J]. Allelopathy J, 47(1):37-56.

LIU XR, LIU CY, XU LQ, et al., 2018, Construction of Ginsenoside-ß-glucosidase gene vector and biotransformation in *Pichia pastoris*[J]. Chem J Chin Univ, 39(11): 2451-2457. [刘欣茹，刘春莹，徐龙权，等，2018. 人参皂苷β-葡萄糖苷酶基因的毕赤酵母载体构建及生物转化[J]. 高等学校化学学报，39（11）：2451-2457.]

LUNDBERG DS, TEIXEIRA PJ, 2018. Root-exuded coumarin shapes the root microbiome[J]. Proc Natl Acad Sci, 115(22): 5629-5631.

QIAO YJ, ZHANG JJ, SHANG JH, et al., 2019. GC-MS-based identification and statistical analysis of liposoluble components in the rhizosphere soils of *Panax notoginseng*[J]. RSC Adv, 9(36): 20557-20564.

REN X, YAN Z, HE X, et al, 2017. Allelochemicals from rhizosphere soils of Glycyrrhiza uralensis Fisch: Discovery of the autotoxic compounds of a traditional herbal medicine[J]. Ind Crops Prod, 97: 302-307.

SHEN H, LEUNG WI, RUAN JQ, et al. 2013. Biotransformation of ginsenoside Rb1 via the gypenoside pathway by human gut bacteria[J]. Chin Med, 8(1): 1-11.

SUDHIR K, GLEN S, LI M, et al., 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Mol Biol Evol, 35(6): 1547-1549.

SUN XT, LI L, LONG GQ, et al., 2015. The progress and prospect on consecutive monoculture problems of *Panax notoginseng*[J]. Chin J Ecol, 34(3): 885-893. [孙雪婷，李磊，龙光强，等，2015. 三七连作障碍研究进展[J]. 生态学杂志，34（3）：885-893.]
TAN Y, CUI YS, JI XL, et al., 2017. Research progress in microorganism changes of rhizospheric soil and root endogenous and ecology during continuous cropping of *Panax notoginseng*[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 48(2): 391-399. [谭勇，崔尹赡，季秀玲，等，2017. 三七连作的根际、根内微生物变化与生态学研究进展[J]. 中草药，48（2）：391-399.]
WANG LT, YANG DY, DENG LM, et al, 2020. Isolation and screening of antagonistic autotoxin-degrading bacteria in *Panax notoginseng*（Burk.）F. H. Chen rhizosphere soil[J] Guangxi Agric Sci, 51(2): 305-312. [王罗涛，杨冬英，邓琳梅，等，2020. 三七根际土壤中皂苷类自毒物质降解拮抗细菌的分离筛选[J]. 南方农业学报，51（2）：305-312.]
WANG W, WANG Z, YANG K, et al., 2020. Biochar application alleviated negative plant-soil feedback by modifying soil microbiome[J]. Front Microbiol, 11: 799.
XIANG W, 2016. Autotoxicity in *Panax notoginseng* of root exudates and their allelochemicals[D]. Nanning：Guangxi University. [向维，2016. 三七根系分泌物的自毒作用及自毒物质研究[D]. 南宁：广西大学.]
XIANG W, WEI XL, TANG H., et al., 2020. Complete genome sequence and biodegradation characteristics of benzoic acid-degrading bacterium *Ppseudomonas* sp. SCB32[J]. BioMed Res Int, 2020: e6146104.
YANG M, CHUAN Y, GUO C, et al., 2018. *Panax notoginseng* root cell death caused by the autotoxic ginsenoside Rg_1 is due to over-accumulation of ROS, as revealed by transcriptomic and cellular approaches[J]. Front Plant Sci, 9: 264.
YANG M, ZHANG X, XU Y, et al., 2015. Autotoxic Ginsenosides in the rhizosphere contribute to the replant failure of *Panax notoginseng*[J]. Plos One, 10(2): e0118555.
YOU PJ, 2009. Study on autotoxicants in soil of *Panax notoginseng* after continuous cropping[D]. Beijing：Beijing University of Chinese Medicine. [游佩进，2009. 连作三七土壤中自毒物质的研究[D]. 北京：北京中医药大学.]
ZHANG QF, LU SX, J YX, et al., 2021, Screening and identification of microorganisms producing ß-glucosidase and their application in transformation of Ginsenoside Compound-K[J]. Shandong Agric Sci, 53(11): 63-69.[张庆锋，吕世鑫，江雨欣，等，2021. 产β-葡萄糖苷酶微生物的筛选鉴定及其在人参皂苷 Compound K 转化中的应用[J]. 山东农业科学，53（11）：63-69.]
ZHANG W, LU LY, HU LY, et al, 2018. Evidence for the involvement of auxin, ethylene and ros signaling during primary root inhibition of arabidopsis by the allelochemical benzoic acid[J]. Plant Cell Physiol, 59(9): 1889–1904.
ZHANG Y, ZHENG Y, XIA P, et al, 2019. Impact of continuous *Panax notoginseng* plantation on soil microbial and biochemical properties[J]. SCI REP-UK, 9(1): 13205.
ZHAO J, WANG P, LIU YN, et al., 2021, Recent advances in biotransformation of ginsenosides[J]. Chem Ind Eng Prog, 40(3): 1238-1247. [赵婧，王盼，刘彦楠，等，2021. 人参皂苷的定向生物转化研究进展[J]. 化工进展，40（3）：1238-1247.]
ZHAO LF, JIAO CX, LI H, et al., 2018. Chemical transformation of protopanaxadiol type ginsenoside Rb1, Rb and Rc analyzed by RRLC-Q-TOF-MS [J]. Chem J Chin Univ, 39(4): 667–673. [赵乐凤，焦传新，李慧，等，2018. RRLC-Q-TOF-MS 研究人参二醇型皂苷 Rb1,Rb2 和 Rc 的化学转化[J]. 高等学校化学学报，39（4）：667–673.]
ZHOU W, LI J, LI X, et al., 2008. Development and validation of a reversed‑phase HPLC method for

quantitative determination of ginsenosides Rb1, Rd, F2, and compound K during the process of biotransformation of ginsenoside Rb1[J]. J Sep Sci, 31(6－7): 921-925.

ZHU XY, SHEN CY, CHEN GW, et al., 2019. Advancement in research on bacterial chemotaxis in soil [J]. Acta Pedol Sin, 56(2): 259-275. [朱晓艳，沈重阳，陈国炜，等，2019. 土壤细菌趋化性研究进展[J]. 土壤学报，56（2）：259-275.]